



ESTUDO DE HOMOGENEIDADE DE FARINHA DE INSETOS COMESTÍVEL PARA PRODUÇÃO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA

Marcelo da Rocha Leão de Magalhães^{1*}, Elvis Joacir De França¹, Ednaldo Barbalho de Lira Júnior¹, Karoline Escarlete Oliveira Varela da Costa¹, Elton Filipe Tenório de Lima¹, Elias Almeida Silva Barbosa¹, Louyze Assunção Cristiano de Oliveira¹, Alesxandro Francisco do Nascimento¹

¹Centro Regional De Ciências Nucleares do Nordeste, CRCN-NE

*Marcelo_rlm@hotmail.com

INTRODUÇÃO

Há escassez de materiais de referência, principalmente no Brasil, considerando todas as análises químicas e matrizes a serem realizadas, o controle da qualidade e a garantia de comparabilidade dos resultados analíticos. Tais materiais possuem alto custo econômico dado às inúmeras etapas de certificação e a morosidade na produção.

Atualmente estão disponíveis no mercado cerca de 8.101 Materiais de Referência (MRs) de diversas propriedades analíticas e com as mais variadas aplicações. Desse total, apenas 141 materiais de referência de produção brasileira foram encontrados, como exemplos pode observar os produzidos pelo Centro de Tecnologia Mineral - CETEM-RJ, pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO, pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas - IPT-SP e pela Visomes Comercial Metrológica LTDA-SP (BAM, 2019).

Entretanto, não há materiais de referência brasileiros cadastrados no COMAR para análises químicas de biomonitorios e alimentos. Já para a matriz insetos, não há nenhum material de referência cadastrado no COMAR, provavelmente devido às dificuldades na obtenção de materiais dessa matriz.

Por outro lado, a alta capacidade de reprodução e porte reduzido desse grupo de seres vivos criam inúmeras possibilidades de fontes sustentáveis de proteína de alta qualidade para alimentação humana em um futuro próximo (UNIVERSITY FOUNDATION, 2016), visto que diversas espécies já são utilizadas para consumo humano em diferentes países. De modo geral, a entomofagia proporciona inúmeros benefícios para a saúde devido ao seu alto valor nutricional, sendo ótima conversora de fontes alimentícias diversas em proteínas; para o ambiente, uma vez que produz consideravelmente menos gases de efeito estufa, utiliza pouco espaço tanto para produção quanto para a alimentação, e reduz bastante as emissões de amônia; para a subsistência, incluindo fatores econômicos e sociais, pois demandam baixa tecnologia para produção e baixo investimento de capital, sendo factível para as diversas classes de trabalhadores urbanos e rurais (VAN HUIS et al., 2013).

Para avaliação de segurança alimentar e composição intrínseca desses insetos, as condições de análises químicas podem ser desfavoráveis, pois cada matriz possui peculiaridades analíticas como a presença de gorduras, fibras musculares e o exoesqueleto de quitina, que dificultam o tratamento químico (BARNES et al., 2014). O efeito de matriz também prejudica a comutatividade, ou seja, a propriedade do MR em atender diversos métodos analíticos para diversos tipos de amostras. Assim, torna-se necessário a disponibilização de MRs com homogeneidade garantida e com

características semelhantes às das amostras de rotina (FERREIRA et al., 2016).

Para avaliar a homogeneidade deste material é primordial a utilização de técnicas analíticas adequadas para promover a escolha de matriz apropriada, determinar suas propriedades de maneira correta. Neste sentido, o Centro Regional de Ciências Nucleares dispõe de Espectrometrias de Absorção Atômica com Chama - FAAS para a quantificação de elementos químicos em diversas amostras, incluindo insetos (MAGALHÃES, 2015; SANTOS, 2016).

Devido à inexistência de matérias de referência desta matriz, a crescente utilização na alimentação humana e animal e as diversas propriedades físicas e químicas inerentes a produção de um Material de Referência. Este estudo teve como objetivo avaliar a homogeneidade de farinha de insetos, utilizando a técnica de FAAS através da determinação das concentrações de Fe e Mn em farinha de insetos comercial de *Zophobas morio*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparação de amostras

Para a avaliação da homogeneidade do candidato a MR foram utilizados larvas de tenébrio gigante (*Zophobas morio*), fornecidos em forma de farinha de insetos desidratados pela empresa Insetos Brasil, localizada de no Município de Camaragibe, Pernambuco.

Aproximadamente 1 kg da farinha de inseto foi levado a um laboratório de preparação do SEAMB do CRCN-NE este ambiente tinha que estar devidamente limpo e adequado para a preparação das amostras. Todo o procedimento de contato com as amostras foi realizado em capela de fluxo laminar Veco (modelo Biosafe - 12) com filtro HEPA (High Efficiency Particulate Arrestance) para evitar a contaminação com elementos químicos exógenos.

Para reduzir o tamanho de partículas ainda mais foi utilizado liquidificador industrial Skymen (modelo LT - 2,0 Super) modificado com lâmina de titânio. Em seguida, a amostra foi para o moinho de bolas com material de moagem de alumina sinterizada para serem cominuídas com adição de sulfato de sódio para auxilia na redução do tamanho de partículas na proporção de 50 % v/v e peneirada em peneira de 63 µm, para seleção da partículas.

Para homogeneização, a amostra peneirada foi transferida para um balde de polietileno e foram utilizadas bolas de vidro para auxiliar no processo, esse recipiente foi envolvido em espuma e selado para evitar danos e contaminação e, em seguida, colocado na betoneira por um período de sete dias. Após este processo, as amostras foram encaminhadas para o quarteamento e envase.

Após a homogeneização, para a composição dos lotes, foram transferidas porções de 20 g de cada amostra, segregadas por quarteador de 8 vias da Sonda Terra, para garantir a correta segregação das porções. As porções homogeneizadas foram transferidas para frascos apropriados previamente limpos. Para a descontaminação, os frascos permaneceram mergulhados em solução de detergente Extran (Merck) 5% v/v durante 24 horas com a conseguinte lavagem com água Milli-Q. Após isso, os frascos foram novamente mergulhados em solução de ácido nítrico (ultra puro) 10% v/v por 24 horas, enxaguando-se novamente realizado com água Milli-Q. Todos os reagentes utilizados na limpeza foram de alto grau de pureza. A secagem dos recipientes foi realizada em capela de fluxo laminar. Ao final, obteve-se um total de frascos de 40 para cada farinha de insetos. Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar para evitar contaminação com particulados atmosféricos. Ao final do quarteamento e envase foram obtidos um total de 40 potes de 20 gramas de amostras de farinha de insetos.

Avaliação da homogeneidade

Foi realizada amostragem sistemática aleatória de cinco frascos para a amostra de candidato a MR, nos quais foram retiradas 3 porções analíticas de 4 g para cada frasco, e de cada uma destas, três sub-porções analíticas de 1,25 g, totalizando 45 sub-porções do candidato a MR.

As amostras e os brancos analíticos foram submetidos ao tratamento químico para a obtenção das soluções de amostras. Este procedimento foi realizado a partir do protocolo estabelecido por Magalhães (2015), sendo realizados vários testes até estabelecer o melhor método. As Porções de 1,25 g de amostras foram transferidas diretamente para tubos de Teflon®, apropriados para uso em forno digestor. Em seguida foi adicionado 8 mL de ácido nítrico ultra puro (HNO₃ p.a.), seguido pelo aquecimento em forno digestor de acordo com o procedimento de rampas de potência abaixo:

1. Etapa de pré-digestão - 330 W durante 5 min;
2. Etapa de digestão - 800 W durante 10 min;
3. Resfriamento - 0 W durante 15 min.

Em seguida, as soluções foram transferidas para a capela de fluxo laminar para atingir equilíbrio térmico e foram filtradas em papel de filtro quantitativo para remoção de qualquer particulado. Os volumes finais foram completados com água Milli-Q em tubos falcon descontaminados para 15 mL para análise através do FAAS. As soluções das amostras e brancos analíticos foram encaminhadas para a análise química por FAAS para determinação das concentrações de Fe e Mn.

A obtenção das curvas analíticas foi realizada utilizando soluções-padrão (Merck) de concentrações conhecidas para cada um dos elementos químicos, o equipamento foi otimizado a partir dos ajustes no ganho da lâmpada de cátodo oco e do fluxo dos gases (mistura acetileno/ar) injetados, cujos parâmetros de análise estão presentes na Tabela 1. Aliquotas das soluções das amostras e brancos analíticos (~1 mL) foram injetadas no espectrômetro de absorção atômica com atomização por chama Agilent modelo 220 FS e analisadas em triplicata. O tempo de injeção para leitura das amostras foi 6 s e tempo de delay foi de 5 s. As frações de massa e incertezas analíticas combinada foram obtidas em planilha Microsoft Excel após os cálculos dos fatores de diluição associado a cada amostra e a respectiva subtração do branco analítico e correção de umidade.

Tabela 1. Parâmetros de análise utilizados para a determinação de Fe e Mn por FAAS.

Analito	Comprimento de onda (nm)	Tipo de chama
Fe	248,3	Ar/acetileno
Mn	279,5	Ar/acetileno

Para determinação de umidade, três porções de 1,25 g foi retirada de cada frasco utilizado, sendo acondicionadas em estufa de circulação forçada por um período de quatro horas e em seguida colocada em dessecador com sílica gel para equilíbrio térmico determinação da umidade através da diferença entre as massas.

Após a obtenção dos resultados foi testada a presença de dados anômalos por meio do teste de Grubbs e a normalidade dos dados. Em seguida, ANOVA foi utilizada para avaliar tanto se havia diferenças significativas em nível de 95% de confiança nas concentrações de elementos químicos nos diferentes frascos analisados, como as diferenças dentro de um mesmo frasco (ABNT, 2012a). Para isso Primeiramente, foi testada a normalidade dos dados por meio do teste de Shapiro-Wilk, após verificada a normalidade dos resíduos e a homocedasticidade das variâncias, aplicou-se a ANOVA para verificar a hipótese de que as concentrações médias obtidas para Fe e Mn não diferem estatisticamente nem entre frascos e nem dentro de um mesmo frasco.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o estudo da homogeneidade intra- e inter- frascos, foram realizadas determinações de Fe e Mn em nove subporções analíticas referentes a três sub amostras de cada frasco escolhido aleatoriamente para o candidato a MR. Inicialmente aplicou-se o teste de Grubbs para identificar resultados anômalos. Por meio do teste de Grubbs, foram observados alguns valores extremos, que foram eliminados para a obtenção dos valores médios em cada frasco.

Os resíduos foram obtidos após a realização da ANOVA no Statistica, gerando-se histogramas das Figuras 1 e 2. De acordo com a rotina do programa de computador, aplicou-se, ainda, o teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade dos resíduos. Esses histogramas devem refletir uma distribuição normal, cuja forma é semelhante a um sino com simetria e apresentar da probabilidade p maior que 0,05 para ter a normalidade confirmada em nível de 95 % de confiança (BINGHAM; FRY, 2010).

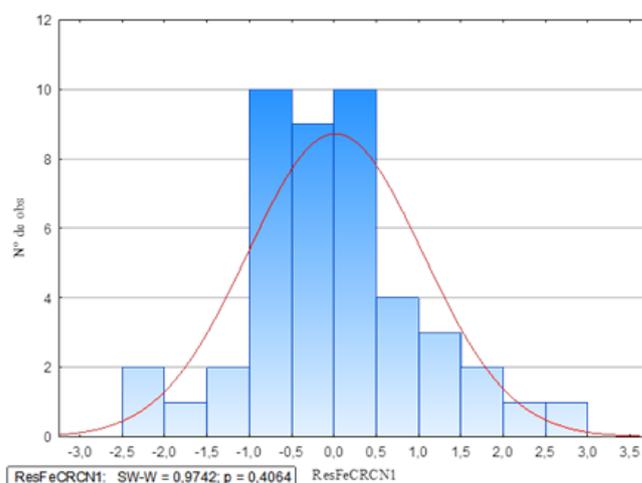


Figura 1. Histograma da distribuição dos resíduos obtidos a partir dos dados de Fe e o valor da probabilidade p do teste de Shapiro-Wilk para avaliação de homogeneidade das concentrações nas amostras avaliadas (Fonte: O Autor).

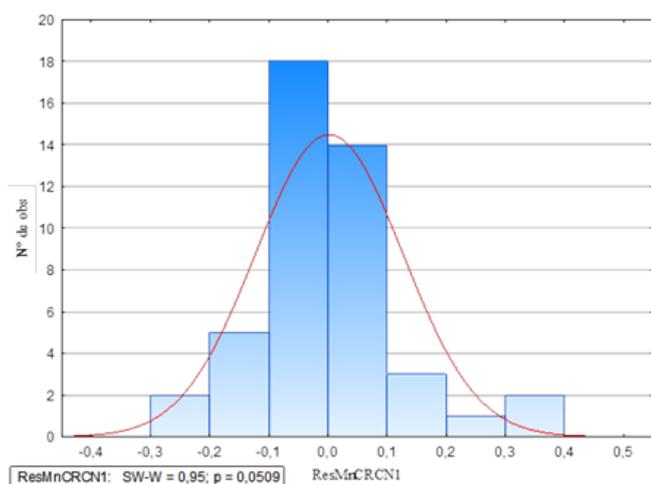


Figura 2. Histograma da distribuição dos resíduos obtidos a partir dos dados de Fe e o valor da probabilidade p do teste de Shapiro-Wilk para avaliação de homogeneidade das concentrações nas amostras avaliadas. (Fonte: O Autor).

Pode-se observar nas figuras acima que para os dois elementos químicos estudados na avaliação da homogeneidade, foram obtidas distribuições simétricas em forma de sino, indicando normalidade dos resíduos, o que é corroborado quando se observam os p valores obtidos por meio do teste de Shapiro-Wilk de 0,4064 para ferro (Figura 1) e 0,0509 para manganês (Figura 2), indicando em nível de 5% de significância a distribuição normal dos resíduos do conjunto de dados em nível de 95% de confiança. O que atesta que pode ser realizado o teste de ANOVA para avaliar a homogeneidade, neste conjunto de dados.

As tabelas 2 e 3 apresentam os valores gerados através da utilização de ANOVA para comparação das concentrações de Fe e Mn, onde foram testadas as possíveis diferenças entre os diferentes frascos, e entre as diferentes subamostras dentro de um mesmo frasco.

Tabela 2. Resultados da ANOVA para a avaliação da homogeneidade intra e inter-frascos das concentrações de Fe.

Efeito	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	p-valor
Frasco	4	11,64	2,91	0,069648
Subamostra	2	1,27	0,63	0,600873
Erro	38	46,64	1,23	-
Total	44	59,54	-	-

Tabela 3. Resultados da ANOVA para a avaliação da homogeneidade intra e inter-frascos das concentrações de Mn.

Efeito	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	p-valor
Frasco	4	0,4747	0,1187	0,000359
Subamostra	2	0,0114	0,0057	0,728338
Erro	38	0,6756	0,0178	-
Total	44	1,1616	-	-

Os resultados mostraram que, para o Mn, a hipótese de que as médias das populações são iguais foi rejeitada ($p < 0,05$) para os diferentes frascos utilizados, porém não foram encontradas diferenças significativas a 95% de confiança para a homogeneidade dentro de um mesmo frasco. Para Fe, a hipótese de que os valores médios sejam iguais foi aceita tanto entre frascos como dentro do mesmo frasco ($p > 0,05$), mostrando que o material pode ser

considerado homogêneo para esse elemento químico (ABNT, 2012). Esse resultado demonstra que o material utilizado no estudo não obteve resultado de homogeneidade adequado para uma futura produção de um material de referência com insetos, pois devido a heterogeneidade observada não se pode garantir resultados rastreáveis e comutáveis para todos os frascos produzidos.

CONCLUSÕES

Neste estudo foram desenvolvidas todas as etapas necessárias para a preparação, definição da propriedade de homogeneidade, um dos requisitos para a produção Material de Referência de insetos como preconizam as normas da International Organization for Standardization - ISO. A partir deste trabalho, conclui-se que:

- Conseguiu-se obter material homogêneo quanto à distribuição das concentrações de Fe, porém houve heterogeneidade para os diferentes frascos quando analisada as concentrações de manganês.
- O Candidato à material de referência não mostrou-se adequado para a produção de material de referência, devendo-se utilizar de outras espécies de insetos para avaliar se suas propriedades intrínsecas satisfazem as condições de propriedades físicas e químicas para a produção de um material de referência utilizando esta matriz, bem como avaliar outras metodologias de preparação e homogeneização destas amostras.

REFERÊNCIAS

- ABNT, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência**. Rio de Janeiro: ABNT, 2012 (ABNT ISO Guia 34).
- ABNT, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Materiais de referência - Princípios gerais e estatísticos para certificação**. Rio de Janeiro: ABNT, 2012a (ABNT ISO Guia 35).
- BAM, Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung. **Certified Reference Materials catalogue**. Berlim: BAM, 2019. BAM, Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung. **Certified Reference Materials catalogue**. Berlim: BAM, 2019.
- BARNES, R. M.; SANTOS JÚNIOR, D.; KRUG, F. J. **Introduction to sample preparation for trace element determination**. In: FLORES, E. M. M. (ed.) **Microwave-assisted sample preparation for trace element determination**. 1a ed. Elsevier, p. 1 - 58, 2014.
- BINGHAM, N. H.; FRY, J. M. **Regression: Linear Models in Statistics (Springer Undergraduate Mathematics Series)**. 1ª ed, New York: Springer, 2010, 300p.
- FERREIRA, R. G.; MONTEIRO, M. A.; PEREIRA, M. U.; DA COSTA, R. P.; SPISSO, B. F.; CALADO, V. **A feasibility study for producing an egg matrix candidate reference material for the polyether ionophore salinomycin**. *Talanta*, v. 155, p. 222-228, 2016.
- MAGALHÃES, M. R. L. **Concentrações naturais de elementos químicos da classe insecta do fragmento florestal de mata atlântica reserva charles darwin**, Recife: Departamento de Energia Nuclear, Universidade Federal de Pernambuco, 2015, 98p. Dissertação de Mestrado.
- SANTOS, M. L. O. **Elementos químicos em invertebrados terrestres como indicadores de qualidade ambiental de áreas urbanas**, Recife: Departamento de Energia Nuclear, Universidade Federal de Pernambuco, 2016, 99p. Dissertação de Mestrado.
- UNIVERSITY FOUNDATION. **Insect protein: feed for the future**. Bruxelas. **Proceedings...** Bruxelas: PROTeINSECT, 2016. 15p.
- VAN HUIS, A.; VAN ITTERBEECK, J.; KLUNDER, H.; MERTENS, E.; HALLORAN, A.; MUIR, G.; VANTOMME, P. **Edible insects: future prospects for food and feed security**. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2013, 201p.